



(11) (A) No 1 231 334

(45) ÉMIS: 880112

(52) CLASSE 260-222

(51) INT. CL. C08B 37/02⁴

(19) (CA) **BREVET CANADIEN** (12)

(54) Dextrane dotés, notamment, de propriétés
anticoagulantes et de propriétés anticomplémentaires,
leur préparation et leurs applications biologiques

(72) Mauzac, Monique;
Jozefonvicz, Jacqueline;
Jozefonvicz, Marcel,
France

(73) Concedé: Choay S.A.
France

(21) DEMANDE No 469,125

(22) DÉPOSÉE: 841130

(30) DATE DE PRIORITÉ: France (83 19110) 831130

REVENDECTIONS 23

Canada

407/44

P R E C I S

"Dérivés du dextrane dotés, notamment, de propriétés anticoagulantes et de propriétés anticomplémentaires, leur préparation et leurs applications biologiques"

Procédé de préparation de dérivés de dextrane comprenant la réaction d'un dextrane avec un dérivé réactif $X(CH_2)_n-R-COOH$, la réaction du dextrane formé avec un dérivé de formule $NH_2-R_1-\text{C}_6\text{H}_4$ puis la substitution nucléophile du noyau aryle.

DERIVES DU DEXTRANE DOTES, NOTAMMENT, DE PROPRIETES
ANTICOAGULANTES ET DE PROPRIETES ANTICOMPLEMENTAIRES,
LEUR PREPARATION ET LEURS APPLICATIONS BIOLOGIQUES

5 L'invention est relative à des dérivés du dex-
trane dotés, notamment, de propriétés anticoagulantes et
de propriétés anticomplémentaires, à leur préparation et
à leurs applications biologiques.

On sait que l'héparine est largement utilisée
10 comme médicament antithrombotique en raison de ses
propriétés anticoagulantes élevées.

Des travaux récents ont également montré son
action vis-à-vis de l'inactivation du système complémen-
taire, c'est-à-dire l'ensemble des protéines plasmatiques
15 jouant un rôle essentiel dans la défense immunitaire de
l'organisme.

L'hétérogénéité de ses chaînes, notamment, en
ce qui concerne leur composition et leur longueur, rend
toutefois difficile l'étude des structures responsables
20 de ses propriétés.

De nombreux travaux ont été entrepris pour éla-
borer des produits présentant au moins certaines des pro-
priétés spécifiques de l'héparine, mais de structure bien
définie pouvant ainsi servir de modèle pour l'étude des
25 mécanismes correspondants mis en jeu.

Certains des co-inventeurs de la présente in-
vention ont ainsi mis au point et décrit (brevets fran-
çais n° 2.461.724 et Européen n° 23.854 des produits
doués de propriétés anticoagulantes constitués par des
30 polymères comportant des groupes :

$-SO_3R_1$, $-R_3SO_3R_1$, $-SO_2R_2$, $-R_3-SO_2-R_2$ et $-CH_2-CO-NH-CHR-$
 $COON-$

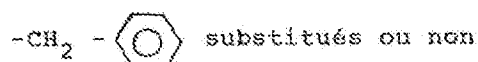
dans lesquels :

R_1 est un atome d'hydrogène ou d'un métal physiologique-
35 ment compatible,

R_2 est un acide aminé lié au pont $-SO_2-$ par la fonction amine,

R_3 est un groupe $-CH_2-CO-NH-R_4$ dans lequel R_4 représente un radical alcoyle, aryle ou alcoylaryle, ou

5



et

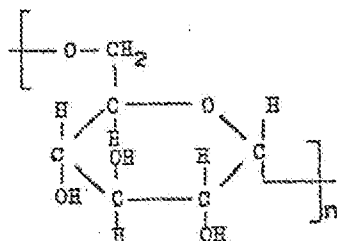
R représente la chaîne latérale d'un acide aminé.

Les travaux des inventeurs dans ce domaine les ont amenés à étudier un polysaccharide déjà connu, à savoir, le dextrane.

Le dextrane est un polyglucoside de poids moléculaire d'environ 5000 à plusieurs millions de daltons, formé d'unités glucosyle A, liées par des enchainements essentiellement 1-6, de formule :

15

20



25

Pour les applications en thérapeutique, on utilise des dextrans de poids moléculaire généralement inférieur à environ 100.00.

30

Ce produit est utilisé, notamment, comme substitut du plasma sanguin ou du moins comme plasma expandeur, ou rétablisseur de volume. Ces utilisations peuvent entraîner cependant, dans certains cas, des chocs immunitaires.

35

Les travaux effectués ont montré que la présence simultanée de certains groupes de substitution, selon des proportions déterminées, sur des chaînes de dextrane dépourvues d'acide aminés leur confèrait des propriétés biologiques de grand intérêt et une tolérance élevée.

L'invention a donc pour but de fournir des dérivés du dextrane possédant au moins certaines des propriétés biologiques de l'héparine et utilisables comme biomatériaux grâce à leur tolérance élevée.


Elle vise également à fournir un procédé de préparation de ces dérivés de mise en oeuvre aisée.


Elle vise également à fournir des biomatériaux solubles et des médicaments ou vecteurs de médicaments de grande efficacité à base de ces dérivés présentant l'avantage d'être obtenus par voie de synthèse.

Les dérivés de dextrane de l'invention sont caractérisés en ce qu'ils possèdent un poids moléculaire supérieur à environ 5000 daltons, et qu'ils comportent de manière statistique,

- au moins 35% environ et plus spécialement 40% de motifs B constitués de motifs osides substitués par des radicaux possédant une fonction carboxyle répondant à la structure $-O-(CH_2)_n-R-COO^-$ dans laquelle R représente une simple liaison ou un groupe $-CO-NH-(CH_2)_n-$, n est un nombre de 1 à 10 et n' est un nombre de 1 à 7, et

- au moins 3% environ de motifs D, c'est-à-dire des motifs constitués de motifs osidiques de type A, substitués par une chaîne comportant un groupe de structure :

$-O-(CH_2)_n-CO-NH-R_1$ 
dans laquelle :


- R_1 représente une simple liaison, un groupe $-CH_2-$, ou un groupe $-CH-CH_2-$  R_2 représente un anion d'un

5 sel minéral ou organique physiologiquement tolérable, plus spécialement un groupe SO_3^- , et n est tel que défini ci-dessus.

La fonctionnalisation du support dextrane à l'aide des chaînes de substitution définies ci-dessus confère
10 de manière avantageuse à ce dernier une activité anticoagulante. Cette activité, bien que plus faible que celle de l'héparine, présente un grand intérêt pour les applications biologiques de ces dérivés.

Ces produits apparaissent, en outre, dotés d'une
15 activité anticomplémentaire du même ordre de grandeur que celle de l'héparine

On observera que ces effets avantageux sont obtenus par la présence simultanée (1) de
20 groupes carboxyle sur les motifs \underline{A} et (2) de chaînes de substitutions, sur les motifs \underline{B} , comportant des groupes aryle substitués par un anion d'un sel minéral ou organique et plus spécialement des groupes arylsulfonates, et reliés à la chaîne de dextrane par un
25 bras comportant un groupe amide.

Selon une disposition avantageuse de l'invention, les dérivés de dextrane renferment en outre des motifs \underline{C} substitués par des radicaux de structure $-O-(CH_2)_n-CO-$
30 $NH-R_1$ , dans laquelle R_1 et n sont tels que définis ci-dessus.

L'ensemble des motifs \underline{A} non substitués du dextrane et des motifs \underline{C} ci-dessus représentent au plus 60% du nombre total de motifs.

- 5 -

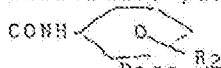
Une famille préférée de dérivés de dextrane selon l'invention comprend des motifs B substitués par une chaîne $-O-CH_2-COO^-$.

Dans une autre famille de l'invention, les motifs B sont substitués par des groupes carboxyéthyle, carboxypropyle ou carboxybutyle $-O-(CH_2)_n-COO^-$, n étant égal respectivement à 2, 3 ou 4.

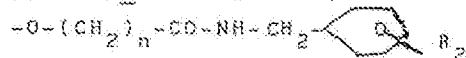
Selon une autre famille préférée, les motifs B sont substitués par des groupes $-O-(CH_2)_n-CO-NH-(CH_2)_{n'}-COO^-$.

Les dérivés dans lesquels n' est égal à 4, 5 ou 7 comprennent un radical $-NH-(CH_2)_{n'}-COO^-$ correspondant respectivement à un groupe acide valérique, acide aminocaproïque et acide aminocaprylique.

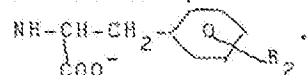
Un groupe préféré de dérivés de dextrane de l'invention renferme, en même temps que les motifs B de l'une des familles définies ci-dessus, des motifs D substitués par une chaîne de structure $-O-(CH_2)_n-$



Dans un autre groupe préféré, les chaînes de dextrane renferment en plus des motifs B ci-dessus, des motifs D substitués par une chaîne de structure



Dans un autre groupe encore, les motifs D sont substitués par une chaîne de structure $-O-(CH_2)_n-CO-$



Dans ces différents groupes, R₂ est tel que défini ci-dessus et représente avantageusement un groupe $-SO_3^-$ et n est un nombre de 1 à 4, de préférence égal à 1.

D'une manière générale, les substitutions des motifs B, C, et D occupent essentiellement la position 2 du motif glucosyle de base. Les dérivés dans lesquels

ces substitutions occupent d'autres positions, ainsi qu'éventuellement la position 2, entrent cependant dans le cadre de l'invention.

De même, l'invention vise également les dérivés dans lesquels une partie des groupes -OH des glucosyles se présentent sous forme -OR₂.

En préparant toute une gamme de dérivés, les inventeurs ont pu mettre en évidence que l'activité anticoagulante devient très faible lorsque le taux des motifs B est inférieur à 35% environ. Il en est de même en l'absence totale de motifs D.

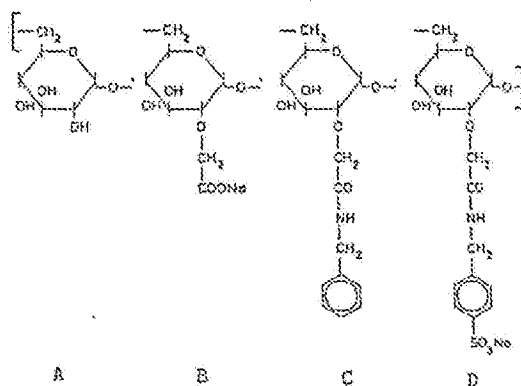
D'une manière générale, pour un taux de motifs B de l'ordre de 40 à 50%, on observe une augmentation de l'activité anticoagulante avec celle du nombre de motifs D et une activité anticomplémentaire sensiblement égale à celle de l'héparine.

Des dérivés de ce type, renfermant 9-12% environ de motifs D, présentent ainsi une activité antithrombique pouvant atteindre des valeurs de l'ordre de 300 à 400 u T/mg environ pour des poids moléculaires plus faibles de l'ordre de 10.000. De tels produits présentent une activité anticomplémentaire de l'ordre de 1 à 10µg/10⁷ EAC 4b3bBBP.

Ces valeurs sont mesurées selon les méthodes exposées dans les exemples.

L'activité antithrombique est plus faible de l'ordre de 1 à 5uT/mg et l'activité anticomplémentaire toujours plus élevée de l'ordre de 1 à 10µg/ 10⁷ EAC 4b3bBBP chez les dérivés possédant un pourcentage plus faible de motifs D d'environ 4%, le taux de motifs B étant de 40 à 50%.

Une catégorie particulièrement préférée de dérivés de l'invention comprend les dérivés de dextrane comportant les motifs A, B, C et D suivants :



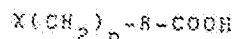
selon les proportions données ci-dessus.

L'invention vise également un procédé de préparation des dérivés de dextrane définis ci-dessus.

5 Selon ce procédé, on met en oeuvre une chaîne de dextrane formée de motifs A non substitués et on élabore successivement les motifs B, C et D, ces motifs étant chacun obtenu à partir de celui préparé auparavant selon l'ordre indiqué.

10 L'élaboration de ces différents motifs sur la chaîne de dextrane comprend avantageusement les étapes suivantes, à savoir :

- la réaction d'un dextrane avec un dérivé de formule :



15 dans laquelle X représente un groupe réactif capable d'établir une liaison de glucosylation avec un groupe -OH d'un motif glucosyle, ce qui conduit à la formation de motifs B;

20 - la réaction du dextrane renfermant les motifs A et B avec un dérivé de formule $NH_2-R_1-\text{C}_6\text{H}_4$ dans laquelle R_1 est tel que défini ci-dessus afin d'obtenir la fixation par un pont amide du groupe aryle substitué au radical provenant des chaînes

de substitution des motifs B, ce qui permet d'introduire des motifs C sur la chaîne,

- la salification des motifs C pour obtenir les motifs D, ou étape d'attaque du noyau aryle par substitution

5 nucléophile,

- le fractionnement éventuel des dérivés de dextrane afin d'éliminer les dérivés présentant un poids moléculaire inférieur à 5000.

La séparation des dextrans peut être effectuée
10 en premier, suivie des étapes évoquées ci-dessus.

Chacune des étapes ci-dessus est éventuellement répétée jusqu'à l'obtention du taux désiré de motifs sur la chaîne.

Pour l'élaboration des motifs B, on fait avanta-
15 geusement réagir avec le dextrane un dérivé réactif tel qu'un halogénure, plus spécialement pour des raisons de disponibilité, un chlorure.

La réaction de glucosylation est effectuée en milieu basique dans des conditions permettant d'éviter
20 la dégradation de la chaîne de dextrane sensible à l'hydrolyse.

A cet égard, le mélange réactionnel basique renfermant le dextrane est porté à une température de l'ordre de 0°C ou inférieure notamment de -4°C à +5°C.

25 Après addition du dérivé réactif, le mélange est porté à une température supérieure à l'ambiante, pouvant atteindre 70°C environ.

De préférence, on procède selon un gradient de température, en faisant croître progressivement la
30 température de l'ambiante à 55°C environ. Le réglage de la température permet de faire varier le rendement de substitution pratiquement à volonté. Il est ainsi possible d'obtenir aussi bien des taux de carboxyle de 40 à 60 % que des taux atteignant 80 % en une étape et

pratiquement 100 % en deux étapes et même les dépassant.

Toute une gamme de produits répondant aux propriétés souhaitées est ainsi accessible.


Cette modulation présente un intérêt étant donné
5 que lorsqu'on souhaite disposer de produits dotés de propriétés anticoagulantes élevées, il est préférable de disposer d'un taux plus faible de motifs B, alors que ce taux doit être plus élevé pour augmenter l'activité anti-complémentaire des dérivés.

10 Le rapport de la concentration en dérivé réactif à celle du dextrane est avantageusement de 1,5 à 3,5.

Afin de permettre la récupération des produits par précipitation, le pH est abaissé jusqu'à un pH neutre.

Les produits sont précipités à l'aide d'un
15 solvant notamment un solvant alcoolique tel que le méthanol.

Lorsque la chaîne R dans les motifs B représente un groupe $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n$, on obtient avantageusement les produits à partir des motifs B substitués par une chaîne $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$ par réaction avec les acides aminés corres-
20 pondants.

L'étape d'élaboration des motifs C comprend le couplage des dérivés de formule $\text{NH}_2 - \text{R}_2$ 

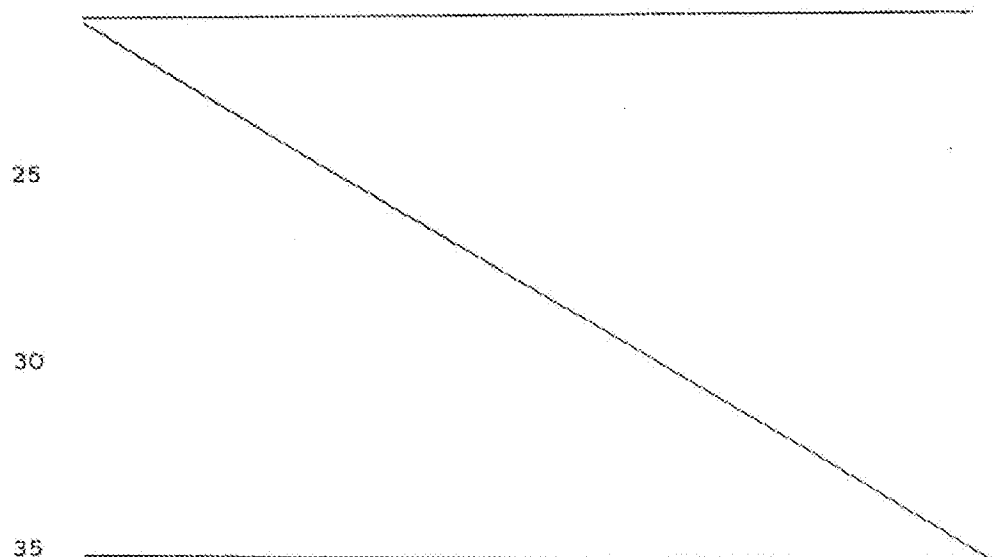
25 avec la chaîne de substitution des motifs B. On utilise avantageusement un agent de couplage en milieu acide, à température ambiante.

Il s'agit d'agents de couplage tels que ceux mentionnés dans l'ouvrage Réactifs IBF "Practical guide for use in affinity chromatography", 1979, p. 34-37, notamment de la N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydro-
30 choline (EEDQ) ou le carbodiimide ou l'IDQ (N-isobutoxy-carbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoline).

Selon une variante permettant de réaliser la réaction avec un rendement élevé, à savoir, environ au moins 10% de substitution, on prépare l'anhydride mixte du dextrane en faisant réagir un chloroformate d'alcoyle (d'éthyle ou d'isobutyle notamment) et un dérivé capable de former un chlorhydrate avec l'acide chlorhydrique libéré tel que la triéthylamine, la N-méthylmorpholine ou analogue. Cette étape d'activation est réalisée de préférence à une température inférieure à 0° C et même à -15° C. Cette réaction s'effectue très rapidement en quelques minutes puis on réalise le couplage à basse température.

Le rapport de la concentration en dérivé à coupler à celle du dextrane substitué est avantageusement de l'ordre de 2 et celui du chloroformate par rapport au dextrane environ de 1.

On fait réagir les chaînes de dextrane formées, renfermant des motifs B avec un dérivé réactif contenant R_2 et permettant de fixer R_2 sur le noyau aryle des chaînes de B.



La substitution par des groupes SO_3^- est avantageusement réalisée à l'aide d'acide chlorosulfonique, dans des conditions diluées afin d'éviter la dégradation de la chaîne de dextrane. Cette étape est réalisée en phase hétérogène et le produit est récupéré,
5 lavé et séché.

Au cours de cette étape, il est possible de substituer jusqu'à environ la moitié des cycles aromatiques des motifs C.

10 L'opération est renouvelée si nécessaire jusqu'à l'obtention du taux de substitution désiré.

En vue de ses applications biologiques, le dextrane substitué ainsi obtenu est lavé puis conservé sous forme lyophilisée.

15 Grâce à ce procédé, il est possible de préparer par voie de synthèse, une gamme de dérivés de dextrane présentant l'avantage d'être solubles, de proportions en motifs de substitutions très variables, ces proportions pouvant être choisies en fonction des propriétés recher-
20 chées.

L'activité biologique des dérivés de dextrane définis ci-dessus a été étudiée à différents niveaux notamment sur certaines protéines de la coagulation, en particulier, la thrombine, et sur le système du complé-
25 ment.

Les résultats obtenus montrent que l'activité de ces dérivés vis-à-vis de la thrombine dépend du pourcentage de motifs B et D.

Cette activité apparaît pour un taux de motifs B supérieur à 35%, plus spécialement à 40% et croît avec
30 le pourcentage de motifs D. Cette activité semble donc résulter d'un effet coopératif entre les chaînes de substitution de B et de D.

L'examen des fractions isomoléculaires de dérivés de l'invention a montré un accroissement très net de l'activité d'inhibition de la thrombine avec la masse moléculaire.

5 L'étude de leur action sur les protéines plasmatiques du système complémentaire a mis en évidence un fort pouvoir d'inhibition vis-à-vis de l'action de la C_3 , convertase alterne, complexe enzymatique capable de priver la protéine C_3 de la voie alterne du système complémentaire.

10 En présence du sang, ces produits sont ainsi capables de conduire, autant que l'héparine, à une diminution de l'hémolyse et à une décroissance de la réponse inflammatoire de l'organisme.

L'intérêt de ces dérivés est encore accru en
15 raison de leur bonne tolérance.

Les tests de toxicité ont été effectués sur des souris d'environ 20 g par injection intraveineuse de 0,5 ml par souris, d'une solution de 40 mg/ml du dextrane modifié conformé à la présente invention dans du
20 soluté NaCl isotonique. Ces tests ont démontré la totale innocuité des produits conformes à la présente invention : aucune réaction ni pendant l'injection, ni pendant 14 jours suivant l'injection, n'a été constatée.

Compte tenu de leurs propriétés, ces dérivés
25 sont particulièrement appropriés pour l'utilisation en tant que substituts de plasma sanguin plus spécialement comme expandeurs avec l'avantage par rapport aux dextrans de diminuer les risques d'hypersensibilités observées dans certains cas.

30 L'invention vise donc également des biomatériaux utilisables comme substituts de plasma sanguin et expandeurs à base des dérivés de dextrane ci-dessus en solution de 5 % à 15 % environ, notamment 10 % environ dans un milieu salin.

Ces expandeurs sont utilisés par exemple à raison d'environ 1,5 à 2 l/jour.

Ces dérivés constituent également de précieux supports pour la fixation de différentes substances à

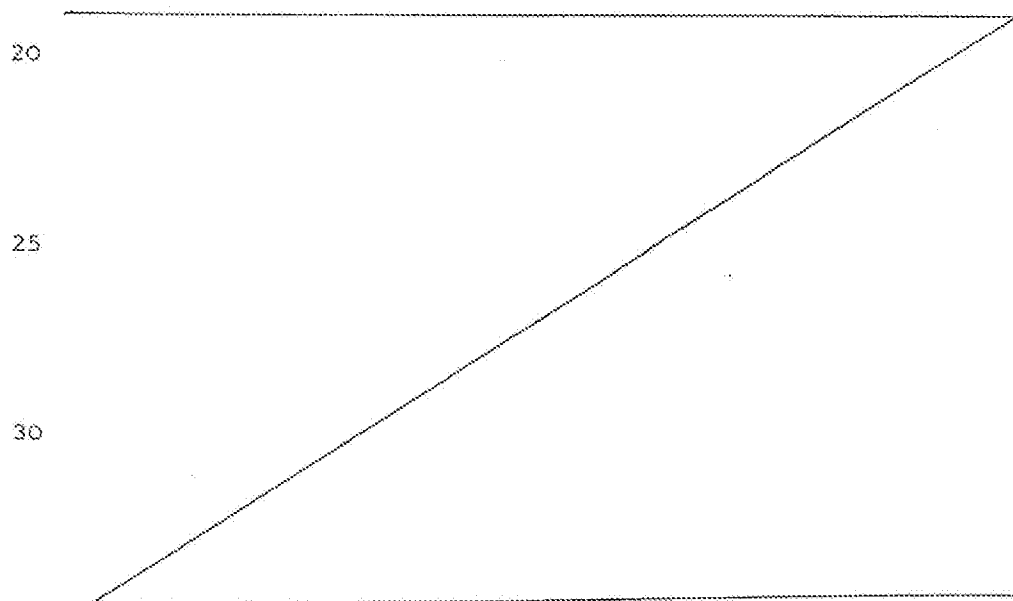
5 activité thérapeutique.

- La figure 1 représente la variation du temps de thrombine (TT) en fonction de la concentration en un dérivé de dextrane (courbe *) et en héparine (courbe *).

10 - Les figures 2a et 2b représentent la variation de l'activité anticoagulante α en u NIHT/mg en fonction respectivement du taux de motifs avec des groupes carboxyle et du taux de motifs avec des groupes sulfonates.

15 - La figure 3 représente la variation de l'activité anticomplémentaire de dérivés de dextrane en $\mu\text{g}/10^7$ EAC 4b3bBbP en fonction de leurs taux en $-\text{COONa}$, et

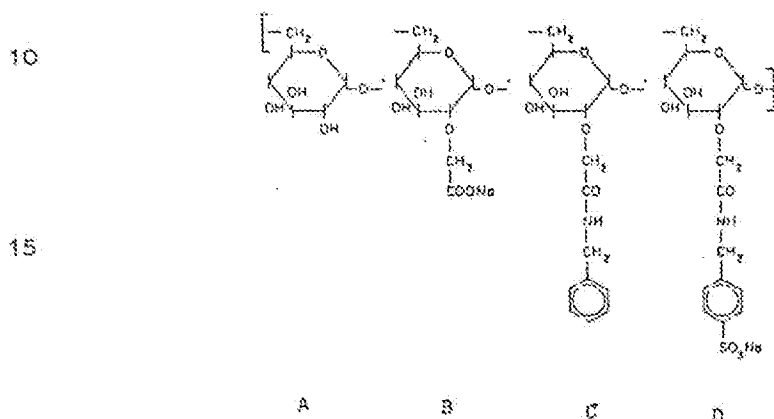
- La figure 4 représente la variation de l'activité anticomplémentaire en $\mu\text{g}/10^7$ EAC 4b3bBbP avec l'activité anticoagulante en u T/mg de dérivés de dextrane.



L'invention est exposée plus en détail dans les exemples qui suivent relatifs à la préparation de dérivés de dextranses et à l'étude de leurs activités biologiques.

EXEMPLE 1 :

- 5 Préparation de dérivés de dextrane comportant les motifs A, B, C et D suivants :



25 On soumet un échantillon de dextrane d'un poids moléculaire supérieur à 8000, la séparation ayant été effectuée par chromatographie liquide sous basse pression, aux étapes 1 à 5 suivantes :

- 30 1) : carboxyméthylation à l'aide d'acide monochloro-acétique -
2) : fixation de benzylamine par couplage de ce dérivé -
3) : sulfonation des noyaux aromatiques de la benzylamine
4) : lavages et conditionnement.

35

1ère étape : carboxyméthylation des dextranes

Cette étape est inspirée par les travaux de F. ANTONINI & Coll. (Giorn. Biochi. 14, 88, 1965).

Dans un ballon de 1 litre muni d'un système d'agitation et immergé aux deux tiers dans un bain (glace + sel (-4°C), on dissout 48,6g de dextrane (0,30 Mole) dans 400 ml de soude 6 (2,4 Moles). On laisse sous agitation à -4°C pendant 20 minutes.

Dans le ballon, on introduit petit à petit (durée d'introduction 10 minutes) 100 g de ClCH_2COOH (1,05 Moles).

On porte la température à 70°C et on maintient à cette température et sous agitation pendant 20 minutes.

On refroidit en immergeant le ballon aux deux tiers dans un bain de glace.

Le pH qui présente une valeur voisine de 11 est ajusté à 7 par addition d'acide acétique.

On précipite le produit à l'aide de 3 litres de méthanol puis on le lave au méthanol et on le sèche dans une étuve sous vide à 40° C environ.

Par cette méthode, on substitue environ 30% des cycles dextranes, sans dégradation des chaînes macromoléculaires. Les substitutions plus importantes sont obtenues en répétant plusieurs fois (n fois) cette opération selon le tableau I ci-après :

TABLEAU I

	n (nombre de carboxyméthylation)	% de motifs dextranes carboxyméthylés
30	1	30-32
	2	45-50
	3	60-65
	4	75-80
	5	90-98
35		

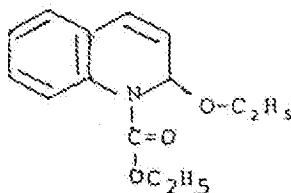
2ème étape : Fixation de la benzylamine

Cette étape est inspirée par les travaux de P.V. SUNDARAM (Biochem. Biophys. Res. Comm. 61,717, 1974)

Dans un ballon de 2 litres, on dissout sous agitation à température ambiante 40 g de carboxyméthyl-dextrane à 90% de motifs dextrans carboxyméthylés (préparé au cours de la 1ère étape) dans 290ml d'eau.

On ajuste le pH à environ 3,5 par de l'acide chlorhydrique 1N.

On verse 89 g (0,360 Mole) de N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (E.E.D.Q.) de formule :



dissous dans 710 ml d'éthanol absolu.

On maintient sous agitation pendant une demi-heure.

On ajoute 40 ml de benzylamine (0,36 Mole) et on laisse sous agitation une nuit.

Après évaporation du mélange presque à sec, on précipite le dextrane à l'aide de 2 litres de méthanol, on lave au méthanol et on sèche à l'étuve sous vide à 40°C.

3ème étape : Sulfonation des noyaux aromatiques de la benzylamine -

12 g de produit obtenus au cours de la 2ème étape et comportant 1 mMole/g de benzylamine sont dispersés sous agitation dans 240 ml de chlorure de méthylène.

On ajoute lentement 2,4 ml d'acide chlorosulfonique (0,036Mole), on laisse le mélange réactionnel sous agitation une nuit, on filtre, on lave à l'éthanol puis on sèche à l'étuve sous vide à 40° C.

5 Par cette méthode, on substitue jusqu'à environ la moitié des cycles aromatiques de la benzylamine.

Pour obtenir les taux de sulfonation désirés, on renouvelle l'opération plusieurs fois.

4ème étape : Lavages et conditionnement -

10 Le produit obtenu en fin de la 3ème étape est dissous dans une solution aqueuse de soude et le pH est maintenu à 8 pendant 2 heures.

Il est ensuite lavé à l'eau, équilibré à pH 7,35 par du tampon de Michaelis, puis relavé à l'eau.

15 Toutes les opérations sont effectuées en utilisant la méthode d'ultrafiltration (membranes semi-perméables à seuil de coupure adapté).

Le produit est finalement lyophilisé.

EXEMPLE 2 :

20 Variante de réalisation de l'étape de carboxyméthylation et de couplage de la benzylamine.

. carboxyméthylation :

En variante, on opère comme suit :

25 On dissout 30 g (0,185 mole) de dextrane de poids moléculaire de 40.000 environ dans 246 ml de soude 6N (1,48 mole) et on agite pendant 20 minutes à cette température.

30 On introduit ensuite lentement dans le ballon 61,2 g de ClCH_2COOH (0,547 mole), en maintenant la température à 20° C.

Le système est ensuite chauffé pour atteindre 55°C au bout de 20 minutes.

La réaction est ainsi maintenue pendant un temps variable t_2 (de 0 à 60 minutes) selon le degré de

substitution désiré (25 % à 85 % de carboxyméthyl-dextrane).

Il est également possible de contrôler le rendement de cette carboxyméthylation en fixant le temps t_2 à 40 minutes et en jouant sur le rapport R_2 de la quantité d'acide monochloroacétique à la quantité de motif dextrane selon $1 \leq R \leq 3,5$.

Couplage de la benzylamine.

Dans un réacteur double enveloppe (6,17 mmols) relié à un cryostat, 1 g de carboxyméthyl dextrane de poids moléculaire de l'ordre de 40 000 (98 % CMD) est dissous dans 8 ml d'eau et on acidifie le milieu à pH 3,5 environ avec HCl concentré. On ajoute alors très lentement 16 ml de diméthylformamide tout en maintenant le pH vers 3,5.

La solution est alors portée à -15°C .

On ajoute ensuite un volume V_1 (0,44 ml) de N-méthylmorpholine et un volume V_2 (0,52 ml) d'isobutylchloroformate.

Une minute après ce dernier ajout, on introduit un volume V_3 (0,49 ml) de benzylamine.

La réaction est maintenue sous agitation pendant un temps t_1 (5 à 60 mn) à -15°C , puis la température est amenée à 20°C et on agite pendant 1 heure.

Le produit est alors tiré sous vide puis précipité dans 500 ml de méthanol, filtré sur fritte puis remis dans l'eau pour être ultrafiltré sur membrane calibrée.

On obtient ainsi des taux de benzylamine fixée variant entre 1 % et 15 % en une étape.

EXEMPLE 3

En procédant comme indiqué dans l'exemple 1 ou 2 ci-dessus, on a préparé une série de produits substitués de façon variée. Ces produits sont rapportés dans le tableau 1 suivant avec une indication de leur composition et de leur masse moléculaire moyenne en nombre.

TABLEAU 1

Référence	\overline{Mn}		Composition		
	Valeur théorique	Mesure par tonométrie	B % ± 1	C % ± 1	D % ± 1
1 (Dextrane)	4900		0	0	0
2 } C.M. Dextrane	5600	5300	30	0	0
3 }	7200	7000	95	0	0
4			51	14	0
5	6714	7100	37	21	0
6			37	11	9
7	6721	6830	37	15	5
8			37	15	6
9			70	7	1
10			71	7	1
11			47	1	3
12	6628	6670	40	12	3
13			40,5	4	4
14			40,5	4	10
15			43	0	15
16			45	0	4
17			60	14	5
18			76	0	4,5
19			58	5	6
20			67	0	5
21	6140	5980	45	0	5
22			50	3	10
23			43	4	11
24			49	1	12
25			68	4	12
26			71,5	0	10
27			75	0	14
28			45	0	14

EXEMPLE 4

Etude du temps de thrombine, du temps de reptilase et de l'activité anticoagulante de dérivés de l'invention.

5 3.1. Temps de thrombine et temps de reptilase.

Méthode :

On mesure le temps de thrombine (TT) et le temps de reptilase (TR).

Le temps de thrombine correspond au temps de
10 formation d'un caillot après addition de thrombine dans un échantillon de plasma ou une solution de fibrinogène.

Le temps de reptilase permet de contrôler que la capacité de transformation du fibrinogène en fibrine n'est pas modifiée par la présence du dérivé de dextrane.

15 Ces mesures sont déterminées automatiquement à 37°C à l'aide d'un coagulomètre Dade KCl, en opérant comme suit :

0,2 ml de plasma pauvre en plaquettes (PPP)
ou de Fibrinogène (6 g/l) est incubé à 37°C avec 0,1 ml
20 de tampon de Michaelis contenant selon une concentration appropriée le dérivé de dextrane dissous.

La durée d'incubation est de 5 mn.

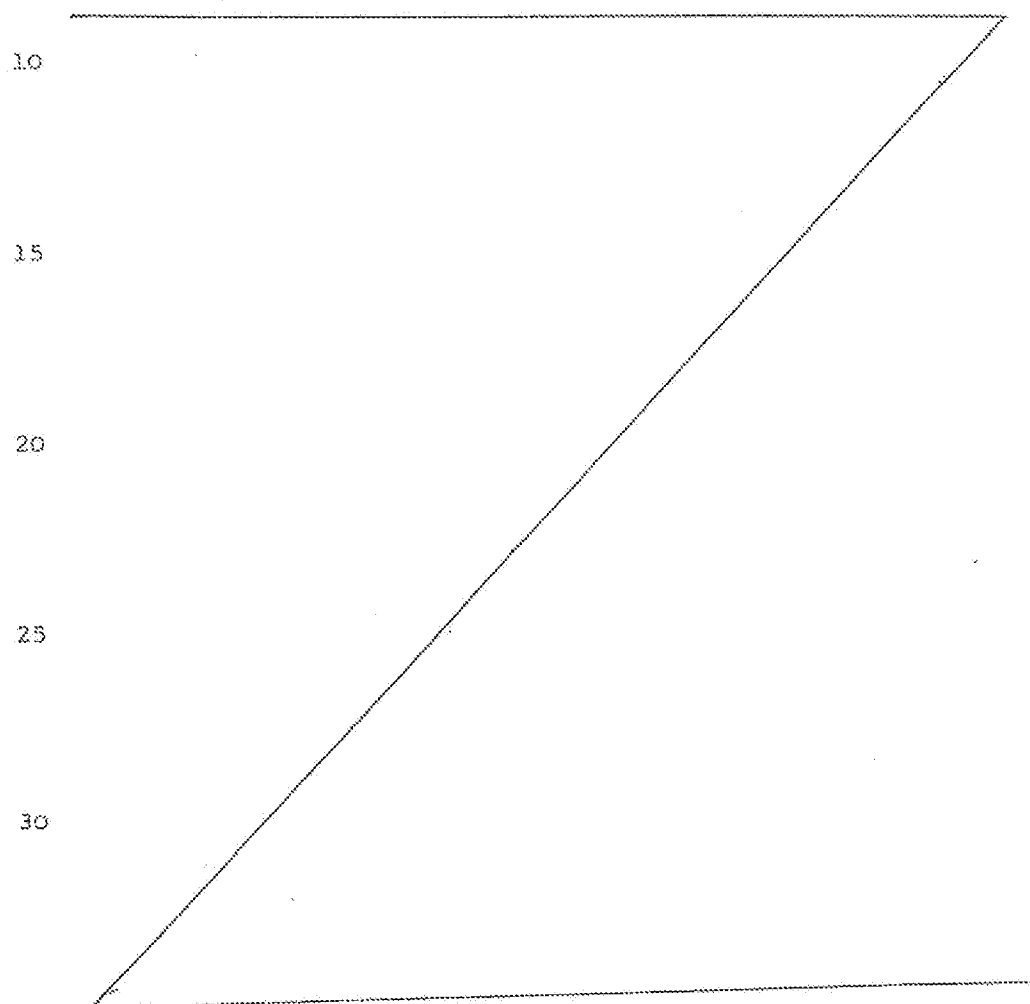
On ajoute 0,1 ml de solution de thrombine
(dans un tampon de Michaelis) ou de reptilase (dans de
25 l'eau distillée) et on mesure le temps d'apparition du caillot (TT ou TR).

Le temps témoin est déterminé avec un volume de tampon exempt de dérivé de dextrane.

L'évolution du TT sur plasma en fonction de
30 la concentration du polymère apparaît parallèle à celle observée avec l'héparine, comme le montre la figure 1. Sur cette figure, on a indiqué la variation du TT en fonction (1) d'un dérivé renfermant 14 % de motif D et 45 % de motif B (courbe a), (2) d'une héparine (courbe b).

L'héparine utilisée possède une activité USP de 173 ui/mg et un poids moléculaire de 10 700 daltons.
Résultats :

Sur le tableau 2, on a apporté les temps de
5 thrombine sur plasma et fibrinogène ainsi que le temps de reptilase, obtenus avec divers dérivés de dextrane (les pourcentages de motifs B, C et D, de ces dérivés sont donnés dans le tableau 1).



Référence (voir Tableau 1)	Concentration initiale (C) du polymère mg/ml	Temps de thrombine : TT sec \pm 1		Temps de reptilase TR (sec \pm 1) sur plasma
		Sur Plasma (Concentration initiale de thrombine : 20 u NIH/ml) Témoin : 8	Sur Fibrinogène 6 g/l NaCl 0,145 M Témoin : 8	
1 (Dextrane)	50	9		
2	50	8		
3 CH Dextrane	50	9		
4	50	9		
5	50	8		18
6	35	20	22	20
7	50	18	18	18
8	40	19		
9	36	21		
10	33	18		
11	20	19	15	18
12	15	21		
13	10	18		
14	6	20		
15	2	18		
16	1,5	21		
17	1,8	20		
18	1,6	20	9	18
19	1,6	21		
20	1,6	21		
21	1,5	21		
22	1,5	19		
23	1,25	20	8	18
24	1	22	8	18
25	1	20		
26	0,8	21		
27	0,3	20		
28	0,3	22		
29	1	19		
30	1	21		
31	0,6	20		
32	0,5	22		
Héparine 173 UI/mg	$6 \cdot 10^{-3}$	18		

Tableau 2 : Temps de thrombine (TT) sur plasma et fibrinogène ainsi que temps de reptilase (TR) des dérivés du dextrane.

On constate que les temps de reptilase ne sont pas allongés en présence de polymère et donc le fibrinogène n'est pas altéré. Cette invariabilité des temps de reptilase autorise de corréler l'allongement des temps de

5 thrombine sur plasma à une activité anticoagulante.

Les temps de thrombine sur fibrinogène sont de l'ordre de celui des témoins lorsque les concentrations en dérivés de dextrane sont faibles.

En revanche, lorsque ces concentrations sont
10 élevées, on observe un léger allongement de ces temps qui pourrait traduire la possibilité d'une action directe du polymère sur la thrombine. Ces observations témoignent en faveur de la participation d'un autre mécanisme tel que celui de l'antithrombine III dans ce mécanisme comme
15 dans le cas de l'héparine.

3.2. Activité anticoagulante :

Méthode :

L'activité anticoagulante (a) est déterminée à partir des temps de thrombine du PPP en présence de
20 diverses concentrations de polymère.

L'activité a est définie comme étant le nombre d'unités de thrombine inactivées par milligramme de produit (uT/mg).

Cette quantité de thrombine inactivée est déterminée à partir d'une courbe de calibration.
25

Dans les mêmes conditions, l'héparine commerciale a un coefficient d'activité a égal à 4000 uT/mg.

Résultats :

On rapporte dans le tableau 3 ci-après les
30 valeurs de l'activité anticoagulante a en uT/mg pour les dérivés considérés dans le tableau 2.

TABLEAU 3

Référence	Activité anticoagulante a (uF/mg)
1 (Dextrane)	0
2 } C.M. Dextrane	0
3 }	0
4	0
5	0
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	2
12	3
13	4
14	6
15	14
16	15
17	16
18	17
19	18
20	18
21	20
22	22
23	23
24	29
25	31
26	40
27	65
28	70

Variation de l'activité anticoagulante α en fonction des proportions respectives de motifs B et D -

Pour les produits 1 à 28 de l'activité α a été reportée sur les figures 2a et 2b en fonction du taux de motifs B portant les groupes carboxyméthyle ou des motifs D sulfonatés.

La figure 2a correspond à la variation de l'activité α des dérivés de dextrane de M_p de départ de 10.500 en fonction du taux de motifs B, avec un taux de motifs D de 15 ± 1 (courbe *), de 11 ± 1 (courbe Δ) de 6 ± 1 (courbe \triangle) et de 2 ± 1 (courbe ∇).

La figure 2 b correspond à la variation de l'activité α des dérivés de dextrane utilisés en fonction du taux de motifs D, le taux de motifs B étant $47,5 \pm 2,5\%$.

L'examen de ces résultats montre qu'on obtient une activité antithrombique lorsque les produits renferment au moins 35% de motifs B.

On note également une augmentation rapide de la valeur α , au-delà du seuil d'apparition de l'activité antithrombotique (figure 2a).

Cette augmentation de α apparaît d'autant plus forte que la proportion de motifs du support dextrane portant des groupes sulfonates est élevée (figure 2b).

25

30

35

Influence du poids moléculaire -

Dans le but d'étudier les corrélations entre masse moléculaire et activité anticoagulante, un dérivé très polydispersé ($\overline{MW} = 15600$, $\overline{Mn} = 74000$, $\frac{\overline{MW}}{\overline{Mn}} : 2,1$);

- 5 moyennement actif de dextrane ($a = 8$ uT/mg a été fractionné comme suit :
- remplissage de la colonne : on utilise un gel préalablement lavé et mis à gonfler dans de l'eau bi-distillée à 20° C pendant une dizaine d'heures, avant d'être intro-
- 10 duit dans une colonne de verre (LKB) de 1 m de long et 2,5 cm de diamètre intérieur.
- éluant : solution aqueuse de NaCl 0,2 M entraînée à 25 ml/h par une pompe à galets "Vario Perpex" (R) (LKB)
- charge : 100 mg de produit dans 5 ml d'éluant
- 15 volumes collectés : 8 ml
- détection de la concentration de la solution éluée : par spectroscopie UV (260 nm).

- Après passage sur cette colonne, le produit est fractionné selon sa masse moléculaire en 5 fractions.
- 20 (Il a été vérifié par dosage chimique que la séparation s'effectuant uniquement en fonction de la masse).
- La masse de chaque fraction a été déterminée par chromatographie d'exclusion liquide sous haute pression (90 bars) sur colonne "Merck Lichrospher" (R) 100 diol.,
- 25 en milieu aqueux NaCl 0,2M, et après étalonnage de la colonne.

L'activité anticoagulante a de chaque fraction est résumée dans le tableau 4a ci-après :

Tableau 4a

5	Fraction	Masse	Activité a (uT/mg)
	1	27.000	20
	2	19.000	14
	3	15.000	8
	4	8.000	6
	5	6.300	3

10 Une opération identique réalisée sur un dextrane ayant un poids moléculaire de l'ordre de 40.000, avec une colonne de 50 cm/40cm, un gel Sephadex S 300 Superfine[®], en utilisant une charge de 500 mg dans 20 ml permet d'obtenir les 5 fractions identifiées dans le tableau 4b suivant :

Tableau 4b

20	Fraction	Masse	Activité a uT/mg
	1	85.000	300
	2	52.000	285
	3	39.500	270
	4	27.500	154
	5	14.500	11

25 Dans le domaine du poids moléculaires considérés, on constate que l'activité anticoagulante croît avec la masse moléculaire.

EXEMPLE 5 :

Etude de l'action des dérivés de l'invention sur les protéines de la phase contact de la coagulation.

30 Les protéines relevant de la phase contact sont celles qui s'activent au contact d'une surface autre que l'endothélium et sont responsables, du moins en partie, de l'activation des autres facteurs de la coagulation.

La kallibréine, enzyme issue de l'activation de la phase contact, amplifie l'activation de ce système.

On rapporte ci-après les résultats obtenus avec des dérivés de dextrane selon l'invention du point de vue de leur action sur les protéines de la phase contact.

Méthode :

Le test révélateur d'activation de la phase contact consiste à doser l'activité enzymatique de la kallikréine. Celle-ci est mise en évidence par l'amidolyse d'un substrat chromogène spécifique de l'enzyme (substrat S2302 commercialisé par Kabi). La vitesse de libération d'un des produits de l'hydrolyse, la paranitroanilline (pNA) est suivie par spectrophotométrie à 405 nm.

L'augmentation de la densité optique par unité de temps à 405 nm est proportionnelle à l'activité enzymatique de la kallibréine.

La réponse de ce test est globale car elle ne permet pas d'analyser séparément les différentes étapes de l'activation de la phase contact.

L'activation par les dérivés du dextrane a été analysée en fonction de leur concentration et, d'autre part, en fonction de la nature et de leur composition en substituant.

Selon les résultats obtenus l'amplitude de l'activation du système contact apparaît comme une fonction croissante de la concentration en dérivé actif du dextrane.

Le pouvoir activateur des polymères vis-à-vis de la phase contact paraît évoluer en fonction de la nature et de la composition en substituants de manière analogue à leur activité anticoagulante : Une augmentation d'activité apparaît au-delà d'un certain taux de motifs B et semble d'autant plus marquée que le taux de motifs D est élevé.

EXEMPLE 6 :

Etude l'action des dérivés de dextrane de l'invention sur le système complémentaire.

On a étudié l'action de dérivés de dextrane de composition chimiques variables sur la C₃ convertase, alterne, complexe enzymatique capable de cliver la protéine C₃, protéine de la voie alterne du système complémentaire.

En présence ou en l'absence d'anticorps spécifiques, le système complémentaire participe aux mécanismes de reconnaissance ou de défense de l'hôte vis-à-vis d'agents infectieux ou de cellules étrangères.

Méthode :

Les érythrocytes portant les fragments C3b (petit fragment libéré par le clivage de C₃) et appelés plus précisément EA C4b 3b, sont séparés à partir d'érythrocytes de moutons sensibilisés (EA) selon le protocole décrit par M-D-Kazatchkine et coll. J. Clin. Invest. 67, 223, 1981.

Les érythrocytes sont ensuite mis en présence de quantités de protéines et stabilisant B, D, P suffisantes pour obtenir un site "C3 convertase amplificatrice" par cellule désigné par EA C4b 3b Bb P. Ces sites activent la voie effective du complément comprenant les protéines plasmatiques C₃-C₄-C₅-C₆-C₇-C₈-C₉ et provoquent l'hémolyse des érythrocytes qui relarguent l'hémoglobine.

Des fractions de 0,1 ml de cette suspension sont prélevées et ajoutées à 0,1 ml de tampon DGVB ++ (tampon Véronal + 0,1% de gélatine et contenant 0,15 mM de Ca⁺⁺ et 0,5 mM de Mg⁺⁺, dilué au 1/2 avec une solution de dextrose à 5% contenant 0,15 mM Ca⁺⁺ et 0,5 mM de Mg⁺⁺) seul ou contenant des quantités adéquates de dextrane modifié conforme à la présente invention.

Le mélange est incubé 30 minutes à 30° C sous agitation.

On ajoute 0,3 ml de sérum de rat dilué au 1/20ème dans du tampon GVA-EDTA (tampon Véronal + 0,1% de gélatine et contenant 0,04 M EDTA).

5 Les sites C3 convertase formés sont révélés par une incubation de 60 minutes à 37° C sous agitation.

On arrête la réaction en ajoutant 1,6 ml de NaCl 0,15M.

10 Les tubes sont centrifugés et l'intensité de la lyse est déterminée par lecture des surnageants à 412 nm par analyse au spectrophotomètre.

Le nombre de sites hémolytiques par cellule est calculé.

Activité inhibitrice

15 L'activité inhibitrice du produit testé est exprimée en pourcentage d'inhibition de formation de la convertase par référence au tube témoin où la convertase a été formée en l'absence de dextrane modifié conforme à la présente invention.

20 Cette activité est exprimée en poids de produit (à volume constant) nécessaire à 50% d'inhibition de formation de la convertase.

Cette activité varie en fonction des motifs.

25

30

35

On rapporte dans le tableau 4 les résultats obtenus avec des dérivés figurant dans les tableaux 1 et 2 ci-dessus en rappelant la composition chimique des produits et leur activité anticoagulante a.

5

	Référence (N° de l'échantillon cf Tableau 1)	Composition chimique			Activité anticoagulante u _g /10 ⁷ ENC 4b 3b Bb P	Activité anticoagulante u NIH T/mg
		B %	C %	D %		
10	1 (Dextrane)	0	0	0	∞	0
	3 (CM Dextrane)	95	0	0	80	0
	4	51	14	0	60	0
15	12	40	12	3	60	3
	16	45	0	4	13	15
	20	67	0	5	11	18
	10	71	7	2	21,5	1
20	7	37	15	5	60	1
	17	60	14	5	10	16
	6	37	11	9	45	1
	23	43	4	11	7,5	23
25	22	50	3	10	4	22
	25	68	4	12	4	31
	26	71,5	0	10	3	40
30	Héparine 159 UI/mg				1	3500

35

L'examen de ces résultats montre que les activités anticomplémentaires des dérivés du dextrane atteignent des valeurs qui sont du même ordre et même pour certains dérivés supérieures à celle de l'héparine.

5 Sur la figure 3, on a représenté l'évolution de l'activité anticomplémentaire des dérivés du dextrane en fonction de leurs compositions chimiques pour des taux de motifs B variant de 10 à 90% et des taux de motifs D égaux à :

10 9-12% : courbe u
4-5% : courbe v
2-3% : courbe w
0% : 0

15 On constate que l'activité inhibitrice croît en même temps que l'augmentation du taux de motifs D pour un taux de motifs B de 40-50%, l'augmentation du taux des motifs B au-delà de cette valeur n'apportant pas d'amélioration. Il est à noter également que l'évolution en fonction de motifs B et D de l'activité anticomplémentaire est très proche de celle de l'activité anticoagulante a.

20 On notera que les dérivés à faibles taux de motifs D présentent déjà une activité anticomplémentaire importante alors que leur activité anticoagulante est très faible.

25 On remarquera, en outre, que la seule présence des motifs C induit une légère activité anticomplémentaire alors qu'elle n'entraîne aucun effet anticoagulant.

30 Sur la figure 4, on rapporte la courbe obtenue en étudiant la corrélation entre l'activité anticomplémentaire et l'activité anticoagulante des dérivés ci-dessus avec les symboles \blacksquare , \blacktriangledown , \bullet , et ∇ correspondant

respectivement à des dextrans renfermant 9 à 12% de motifs D, 4 à 5%, 0% et 2 à 3%.

Cette figure met en évidence la possibilité d'obtenir des produits dotés d'une forte activité anti-
5 complémentaire et d'une activité anticoagulante faible.

10

15

20

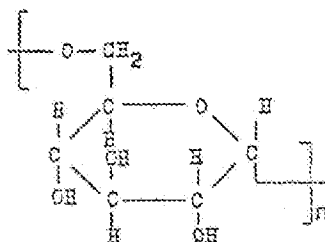
25

30

35

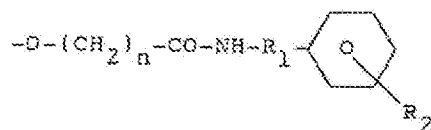
REVENUDICATIONS

1. Procédé de préparation de dérivés de dextrane possédant un poids moléculaire supérieur à environ 5000 daltons et comportant de manière statistique, - des motifs glucosyle A, liés par des enchainements 1-6, de structure :



- au moins 35% environ de motifs E constitués de motifs osides substitués par des radicaux possédant une fonction carboxyle répondant à la structure $-O-(CH_2)_n-R-COO^-$ dans laquelle E représente une simple liaison ou un groupe $-CO-NH-(CH_2)_{n'}-$, n- est un nombre de 1 à 10 et n' est un nombre de 1 à 7, et

- au moins 3% environ de motifs D, c'est-à-dire des motifs constitués de motifs osidiques de type A mais substitués par une chaîne comportant un groupe de structure :



dans laquelle :

- R₁ représente un groupe -CH₂-, ou un groupe $\begin{array}{c} \text{-CH-CH}_2\text{-} \\ | \\ \text{COO}^- \end{array}$,

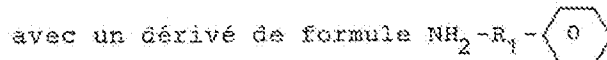
R_2 représente un anion d'un sel minéral ou organique physiologiquement tolérable, et n est tel que défini ci-dessus, ce procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend :

- la réaction d'un dextrane non substitué A avec un dérivé de formule :

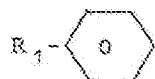


dans laquelle X représente un groupe réactif capable d'établir une liaison de glucosylation avec un groupe -OH d'un motif glucosyle, ce qui conduit à la formation de motifs B, ou en variante, pour préparer les motifs B on forme l'anhydride mixte du dextrane en faisant réagir un chloroformate d'alcoyle et un dérivé capable de former un chlorhydrate avec l'acide chlorhydrique libéré, cette étape d'activation étant réalisée à une température inférieure à 0° C, puis on réalise le couplage à basse température.

- la réaction du dextrane renfermant les motifs A et B



dans laquelle R_1 est tel que défini ci-dessus afin d'obtenir la fixation par un pont amide du groupe aryle substitué au radical provenant des chaînes de substitution des motifs B, ce qui permet d'introduire des motifs C sur la chaîne; ces motifs correspondant aux motifs A mais substitués par des radicaux de structure $-O-(CH_2)_n-CO-NH-$



dans laquelle R_1 et n sont tels que définis ci-dessus.

- la salification des motifs C pour obtenir les motifs D.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fractionnement des dérivés de dextrane, afin d'éliminer les dérivés présentant un poids moléculaire inférieur à 5.000.

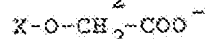
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait réagir le dextrane avec un halogénure en milieu basique.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le mélange réactionnel renfermant le dextrane est porté à une température de -4 à $+5^{\circ}\text{C}$, puis après addition du réactif à une température supérieure à l'ambiante.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rapport de la concentration en dérivé réactif à celle du dextrane est de 1,5 à 3,5.


6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lorsque la chaîne R dans les motifs B représente un groupe $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n$, on obtient les produits à partir des motifs B substitués par une chaîne $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$ par réaction avec les acides aminés correspondants.

7. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que pour former les motifs B répondant à la structure $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$, on utilise un dérivé de formule:

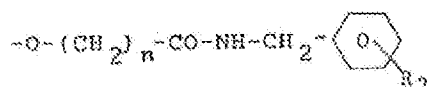


8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'on forme des motifs B substitués par des groupes carboxyéthyle, carboxypropyle ou carboxybutyle $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{COO}^-$, n étant égal respectivement à 2, 3 ou 4.

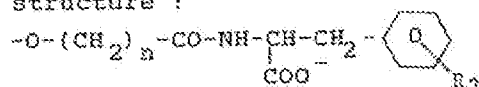
9. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme des motifs B substitués par des groupes $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{COO}^-$.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme des motifs D substitués par une chaîne de structure $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-$ 

11. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme des motifs D substitués par une chaîne de structure :



12. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on forme des motifs D substitués par une chaîne de structure :



13. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on répète les étapes jusqu'à l'obtention du taux désiré de motifs sur la chaîne.

14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on introduit de 9 à 12% de motifs D.

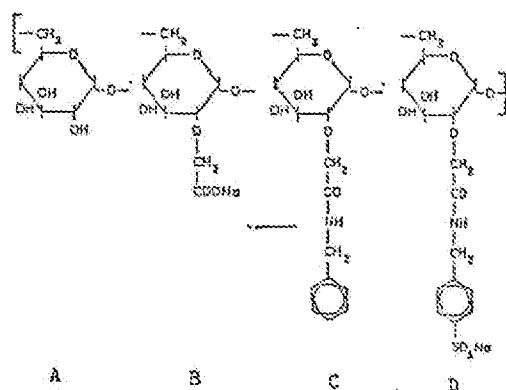
15. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'ensemble des motifs A non substitués et des motifs C représente au plus 60% du nombre total de motifs.

16. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'une partie des groupes -OH des glucosyles se présentent sous forme $-OR_2$.

17. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le rapport de la concentration en dérivé à coupler à celle du dextrane substitué, dans la variante de préparation des motifs B, est de l'ordre de 2 et celui du chloroformate par rapport au dextrane environ de 1.

18. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on fait réagir les chaînes de dextrane formées, renfermant des motifs B avec un dérivé réactif contenant R_2 et permettant de fixer R_2 sur le noyau aryle des chaînes de B.

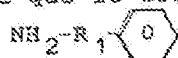
19. Procédé de préparation de dérivés de dextrane comportant A, B, C et D suivants :



caractérisé en ce qu'on soumet un échantillon de dextrane d'un poids moléculaire supérieur à 8000, aux étapes de :

- carboxyméthylation à l'aide d'acide monochloroacétique,
- fixation de benzylamine par couplage de ce dérivé,
- sulfonation des noyaux aromatiques de la benzylamine.

20. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le couplage des dérivés de formule :

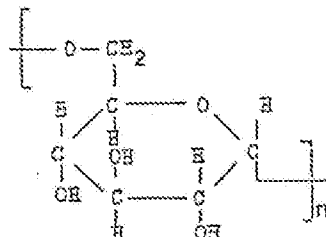


est réalisé en présence d'un agent de couplage en milieu acide, à température ambiante.

21. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise la substitution des motifs C par des groupes SO_3^- à l'aide d'acide chlorosulfonique.

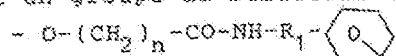
22. Dérivés de dextrane tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'ils possèdent un poids moléculaire supérieur à environ 5000 daltons et comportent de manière statistique,

- des motifs glucosyle A, liés par des enchaînements 1-6 de structure :



- au moins 35% environ de motifs B constitués de motifs osides substitués par des radicaux possédant une fonction carboxyle répondant à la structure $-O-(CH_2)_n-R-COO^-$, dans laquelle R représente une simple liaison ou un groupe $-CO-NH-(CH_2)_n-$, n est un nombre de 1 à 10 et n' est un nombre de 1 à 7, et

- au moins 3% environ de motifs D, c'est-à-dire des motifs osidiques de type A mais substitués par une chaîne comportant un groupe de structure :



dans laquelle :

- R_1 représente un groupe $-CH_2-$, ou un groupe $-\underset{\text{COO}^-}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$

- R_2 représente un anion d'un sel minéral ou organique physiologiquement tolérable, et n est tel que défini ci-dessus.

23. Dérivés de dextrane tels qu'obtenus par mise en œuvre du procédé selon la revendication 19, caractérisés en ce qu'ils comportent les motifs A, B, C et D suivants :

1231334

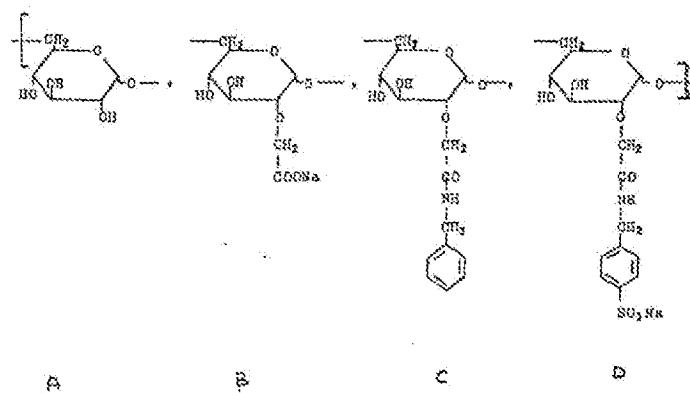
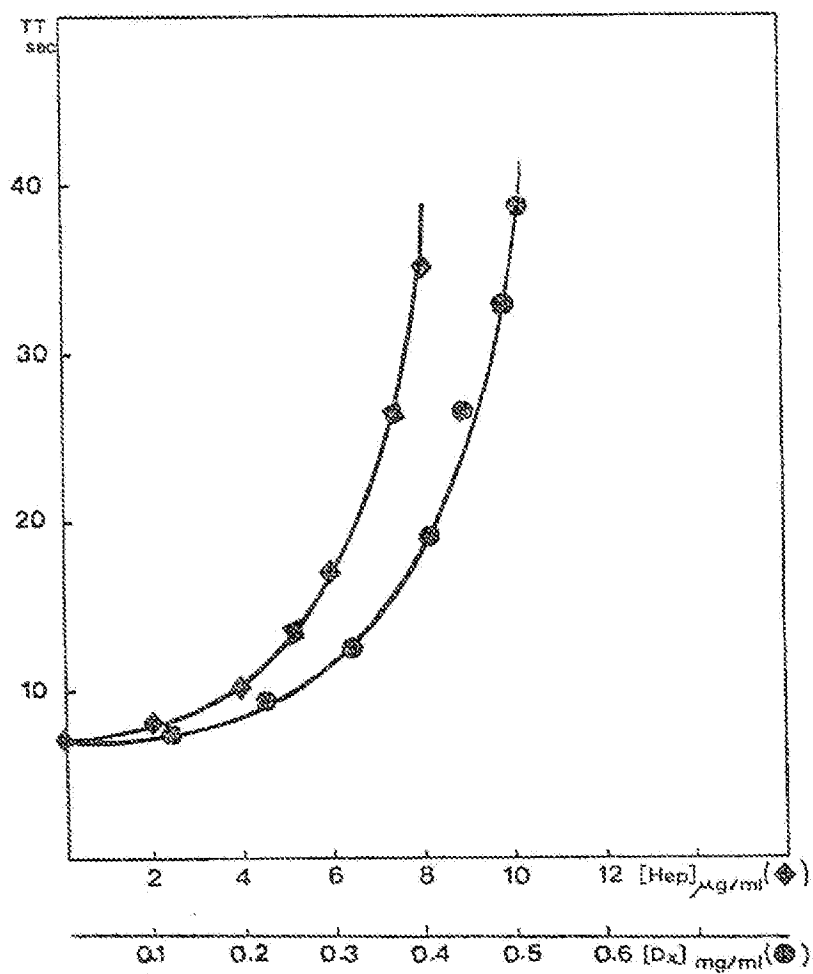


FIG. 1.



Gradient Elution Data of Hep and Dx

FIG. 2a.

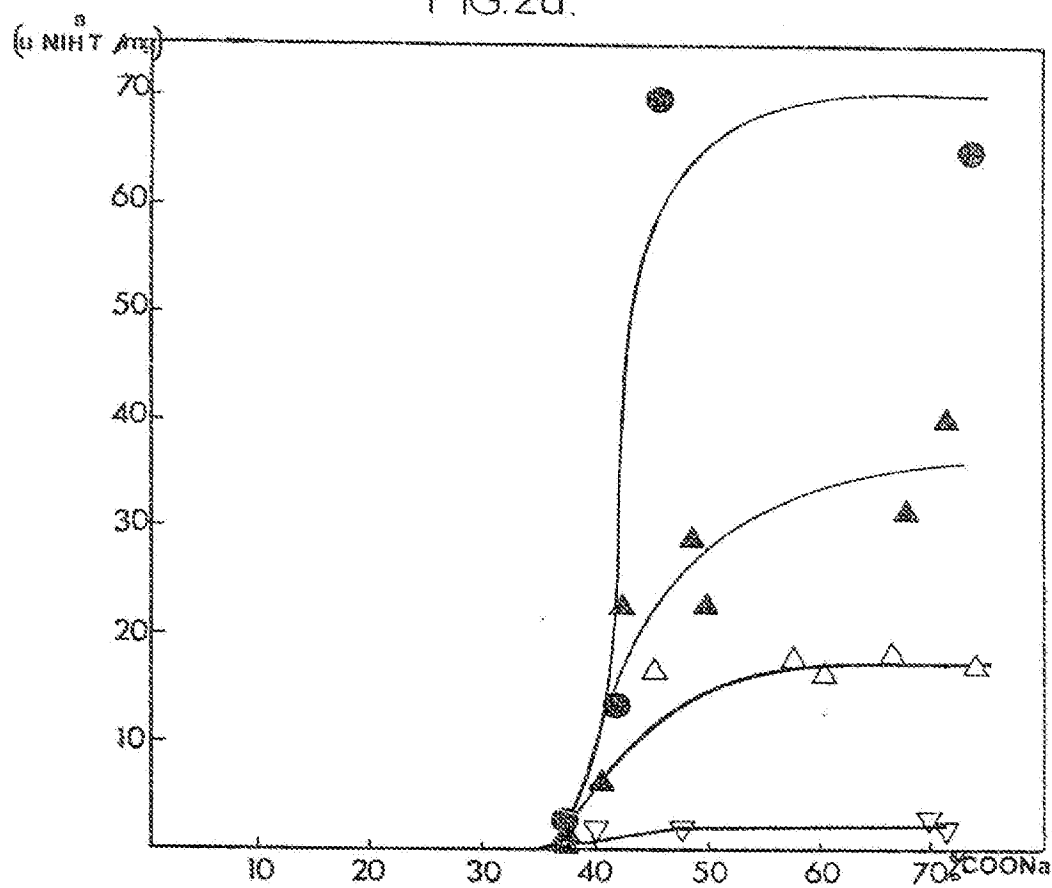
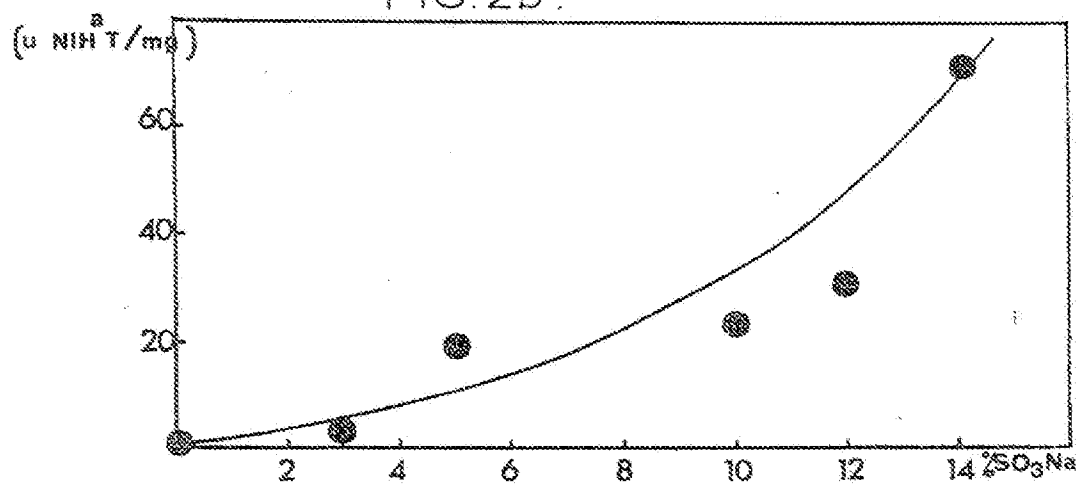
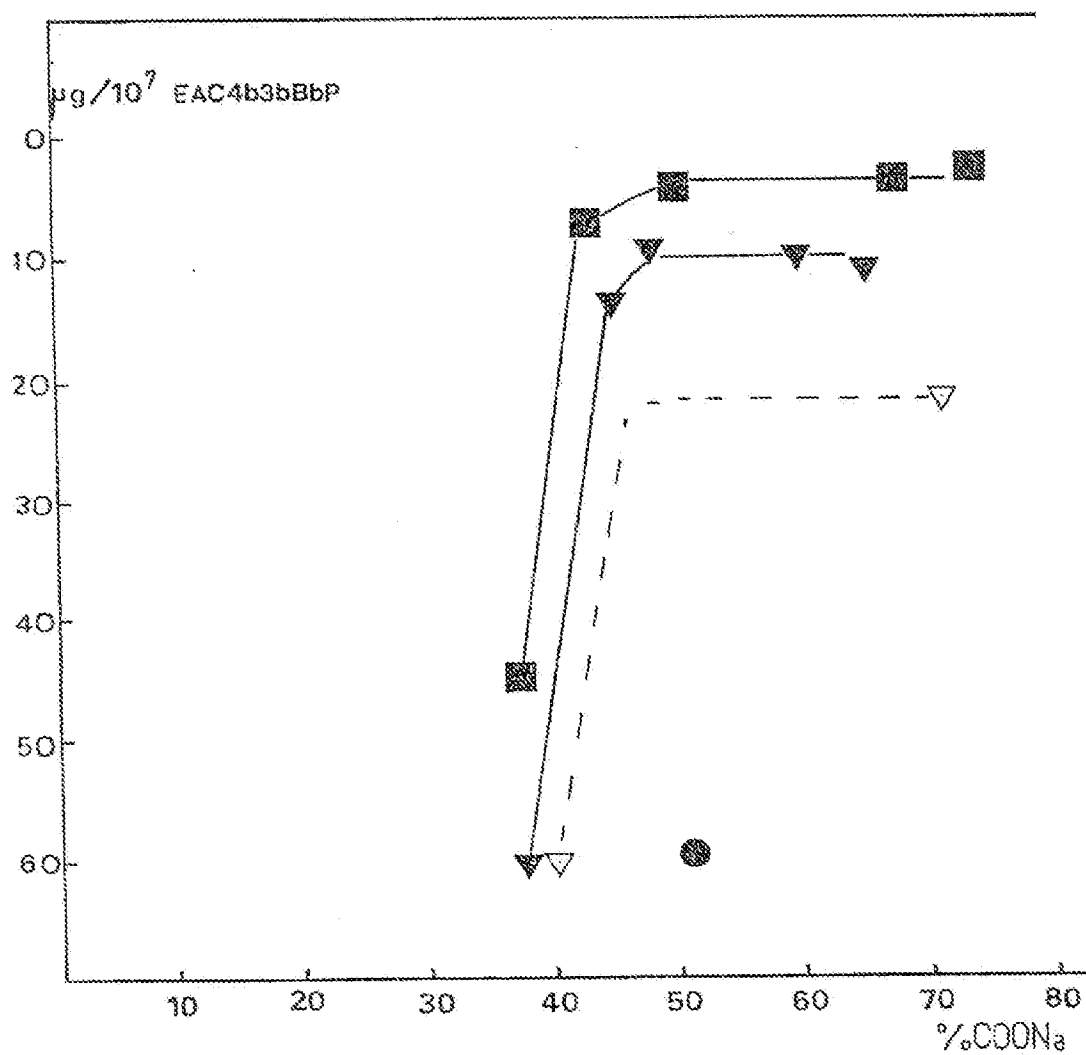


FIG. 2b.



Andrew Hoge, Arthur L. Martinez, Walker

FIG.3.



Andrew Rags Dumas & Martinson Walker

1231334

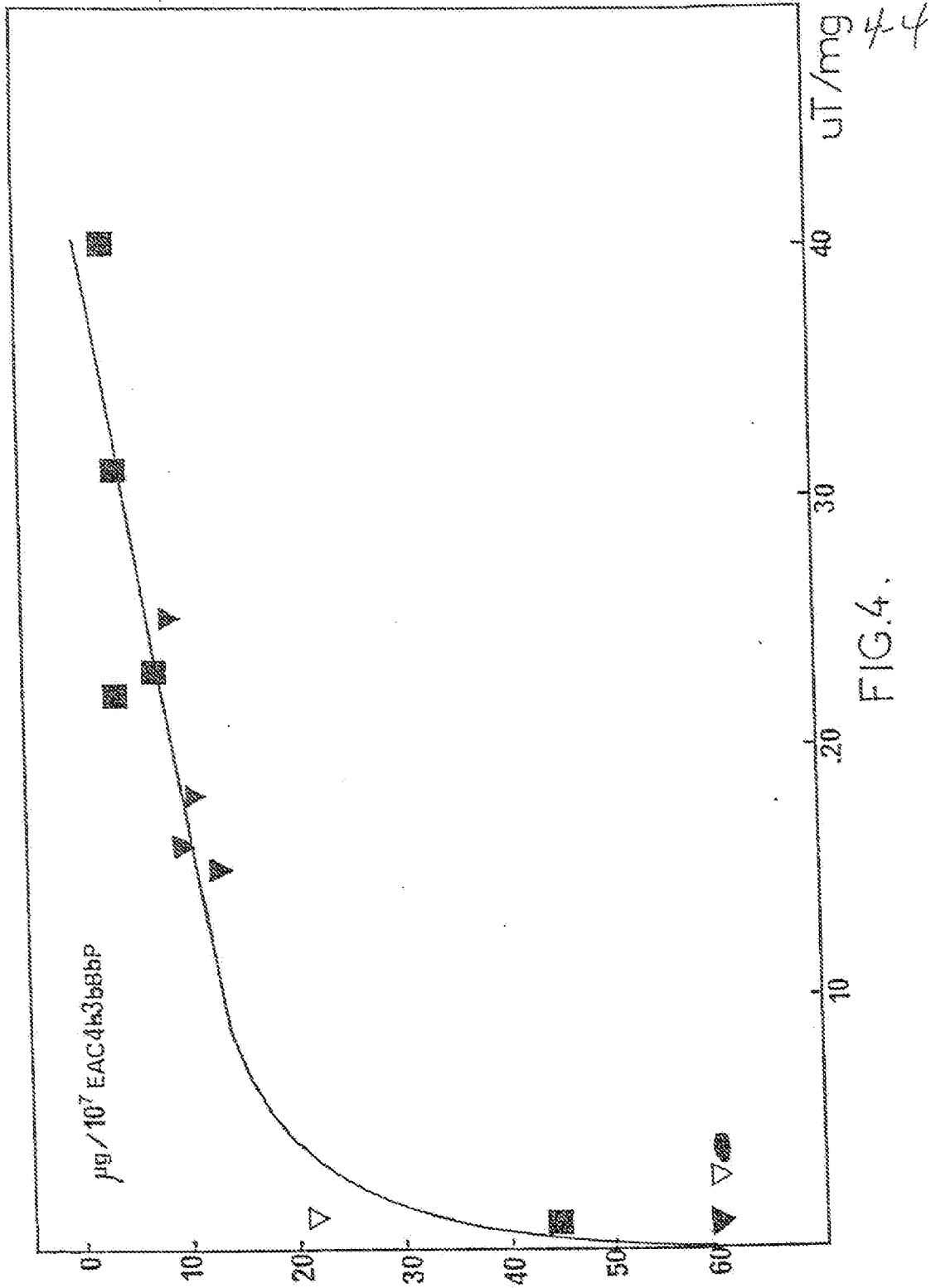


FIG. 4.

Sunderman, Raga, Dubus & Hertmann Walker